# Translation





RECEIVED 659 AUG 23 2000

# **PCT**

TEICH CENTER

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

			09/20000			
Applicant's or agent's file reference 9572	FOR FURTHER AC		Notification of Transmittal of International ninary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)			
International application No.	International filing date	e (day/month/ye	ear) Priority date (day/month/year)			
PCT/EP98/05738	09 September 199	98 (09.09.19	98) 09 September 1997 (09.09.1997)			
International Patent Classification (IPC) or n C12Q 1/68, C07H21/00  Applicant						
BIOTECON GESELLSCHAFT FU	UR BIOTECHNOLO MB	OGISCHE E H	ENTWICKLUNG UND CONSULTING			
This international preliminary example Authority and is transmitted to the approximately and the second secon	nination report has been pplicant according to Art	en prepared by ticle 36.	this International Preliminary Examining			
2. This REPORT consists of a total of	sheets, i	including this c	over sheet.			
This report is also accompan been amended and are the bates (see Rule 70.16 and Section	asis for this report and/or	sheets contain	escription, claims and/or drawings which have ing rectifications made before this Authority under the PCT).			
These annexes consist of a to	otal of 6 sh	neets.				
3. This report contains indications relat	ing to the following item	ıs:				
I Basis of the report						
II Priority						
III Non-establishment	of opinion with regard to	o novelty, inver	ntive step and industrial applicability			
IV Lack of unity of inv	IV Lack of unity of invention					
V Reasoned statement citations and explan	V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement					
VI Certain documents	cited					
VII Certain defects in the	VII Certain defects in the international application					
VIII Certain observation	s on the international ap	plication				
Date of submission of the demand	I	Date of comple	tion of this report			
09 March 1999 (09.03.1	999)	10	0 November 1999 (10.11.1999)			
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany	2	Authorized office	сег			

Telephone No. 49-89-2399-0

Facsimile No. 49-89-2399-4465



International application No.

PCT/EP98/05738

the description, pages 1-3,5-20 , as originally filed, pages filed with the demand, pages 4,4a , filed with the letter of pages filed with the demand, pages filed with the demand, pages filed with the letter of pages	the description, pages 1-3,5-20 , as originally filed, pages filed with the demand, pages 4,4a , filed with the letter of pages filed with the demand, pages filed with the demand, pages filed with the letter of pages		the international	application as origina	lly filed.	AUG 23 20
pages 4.4a , filed with the letter of 20 October 1999 (20.10.1999)  pages , filed with the letter of  the claims, Nos. , as originally filed, Nos. , as amended under Article 19, Nos. , filed with the demand, Nos. , filed with the letter of 20 October 1999 (20.10.1999)  Nos. , filed with the letter of  the drawings, sheets/fig , as originally filed, sheets/fig , filed with the letter of  amendments have resulted in the cancellation of:  the description, pages  the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).	pages 4.4a , filed with the letter of 20 October 1999 (20.10.1999)    pages	$\boxtimes$	the description,	pages1-3,5	20 , as originally filed,	
the claims,  Nos	the claims,  Nos			pages	, filed with the demand,	SENIER 160
the claims,  Nos, as originally filed,  Nos, filed with the demand,  Nos, filed with the letter of	the claims,  Nos, as originally filed,  Nos, filed with the demand,  Nos, filed with the letter of			pages 4,4	filed with the letter of	20 October 1999 (20.10.1999)
Nos, as amended under Article 19,  Nos, filed with the demand,  Nos, filed with the letter of	Nos, as amended under Article 19,  Nos, filed with the demand,  Nos, filed with the letter of			pages	, filed with the letter of	
Nos	Nos	$\boxtimes$	the claims,	Nos.	, as originally filed,	
Nos. 1-18 , filed with the letter of 20 October 1999 (20.10.1999)  Nos. , filed with the letter of  the drawings, sheets/fig , as originally filed, sheets/fig , filed with the demand, sheets/fig , filed with the letter of amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages the claims, Nos. the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).	Nos. 1-18 , filed with the letter of 20 October 1999 (20.10.1999)  Nos. , filed with the letter of  the drawings, sheets/fig , as originally filed, sheets/fig , filed with the demand, sheets/fig , filed with the letter of amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages the claims, Nos. the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).			Nos.	, as amended under Artic	cle 19,
Nos, filed with the letter of	Nos, filed with the letter of			Nos.	, filed with the demand,	
the drawings, sheets/fig, as originally filed, sheets/fig, filed with the demand, sheets/fig, filed with the letter of sheets/fig, filed with the letter of amendments have resulted in the cancellation of:  the description, pages the claims, Nos.  the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).	the drawings, sheets/fig, as originally filed, sheets/fig, filed with the demand, sheets/fig, filed with the letter of sheets/fig, filed with the letter of amendments have resulted in the cancellation of:  the description, pages the claims, Nos.  the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).			Nos. 1-18	, filed with the letter of	20 October 1999 (20,10,1999)
sheets/fig, filed with the demand, sheets/fig, filed with the letter of sheets/fig, filed with the letter of amendments have resulted in the cancellation of:	sheets/fig, filed with the demand, sheets/fig, filed with the letter of sheets/fig, filed with the letter of amendments have resulted in the cancellation of:			Nos.	, filed with the letter of	
sheets/fig, filed with the letter of	sheets/fig, filed with the letter of		the drawings,	sheets/fig	, as originally filed,	
sheets/fig, filed with the letter of amendments have resulted in the cancellation of:  the description, pages the claims, Nos the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).	sheets/fig, filed with the letter of amendments have resulted in the cancellation of:  the description, pages the claims, Nos the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).			sheets/fig	, filed with the demand,	
amendments have resulted in the cancellation of:  the description, pages the claims, Nos the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).	amendments have resulted in the cancellation of:  the description, pages the claims, Nos the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).			sheets/fig	, filed with the letter of	
the description, pages the claims, Nos the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).	the description, pages the claims, Nos the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).			sheets/fig	, filed with the letter of	-
the claims, Nos the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).	the claims, Nos the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).	ameno	lments have resulte	ed in the cancellation of	f:	
the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).  itional observations, if necessary:	the drawings, sheets/fig  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).		the description,	pages		
This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).	This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).		the claims,	Nos.	and the contract of the contra	
This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).	This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).		the drawings,	sheets/fig		
		to go	o beyond the discle	sure as filed, as indica	if) the amendments had not been ma ted in the Supplemental Box (Rule	ide, since they have been considered 70.2(c)).

### Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

Pages which were submitted on 28.12.1998: Pursuant to PCT Rule 13ter.1(f), sequence listings submitted after the filing date and not characterised as amendments shall not be considered part of the description and are not appended to this report as an annex either.

International application No.
PCT/EP 98/05738

V.	Reasoned statement under Article 3 citations and explanations supporti	35(2) with regard to nove ng such statement	lty, inventive step or industrial app	licability;
1.	Statement			
	Novelty (N)	Claims	1-18	YES
		Claims		NO
	Inventive step (IS)	Claims	1-18	YES
		Claims		NO
	Industrial applicability (IA)	Claims	1-18	YES
		Claims		NO

2. Citations and explanations

All of the present claims refer to specific nucleic acid sequences which permit the detection of bacteria of the genus *Pseudomonas*. The claimed nucleic acid sequences are neither disclosed in the prior art, nor are they obvious therefrom. Furthermore, the selected sequences are able to detect a surprisingly large selection of different strains of the species *Pseudomonas aeruginosa* without producing false positive results with bacteria of other species or genera (see Table 1).

Claims 1-18 thus meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step (PCT Art. 33(2) and (3)).

hternational application No.
PCT/EP 98/05738

VII.	Certain	defects	in	the	international	application
------	---------	---------	----	-----	---------------	-------------

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The description is not in conformity with the claims, in contravention of PCT Rule 5.1(a)(iii).

PCT/EP 98/05738

### VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The functional feature "wherein the nucleic acid molecule permits the detection of bacteria of the genus Pseudomonas" should have been included in Claim 5 in such a way that it clearly refers to all of the variants (i)-(iv) (PCT Art. 6).

# VERTRAG JER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

# **PCT**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	Recherchenberichts (	die Übermittlung des internationalen Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit
9572-BIOTECON	VORGEHEN zutreffend, nachstehe	
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
PCT/EP 98/05738	09/09/1998	09/09/1997
Anmelder BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR I	BIOTECHNOLOGISCHet al	
Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem In	_	erstellt und wird dem Anmelder gernäß
	aßt insgesamt <u>3</u> Blätter. veils eine Kopie der in diesem Bericht genannte	n Unterlagen zum Stand der Technik bei.
Grundlage des Berichts     a. Hinsichtlich der Sprache ist die inte durchgeführt worden, in der sie eing	rnationale Recherche auf der Grundlage der int gereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts	ernationalen Anmeldung in der Sprache s anderes angegeben ist.
Die internationale Recherch Anmeldung (Regel 23.1 b))	e ist auf der Grundlage einer bei der Behörde e durchgeführt worden.	ingereichten Übersetzung der internationalen
Recherche auf der Grundlage des S	n Anmeldung offenbarten <b>Nucleotid- und/oder</b> Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das Idung in Schriflicher Form enthalten ist.	Aminosäuresequenz ist die internationale
zusammen mit der internatio	onalen Anmeldung in computerlesbarer Form ei	ngereicht worden ist.
	h in schriftlicher Form eingereicht worden ist.	
	h in computerlesbarer Form eingereicht worden	ist.
Die Erklärung, daß das naci	hträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotol im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgele	koll nicht über den Offenbarungsgehalt der
Die Erklärung, daß die in ∞ wurde vorgelegt.	mputerlesbarer Form erfaßten Informationen de	m schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen,
2. Bestimmte Ansprüche hal	oen sich als nicht recherchierbar erwiesen (s	iehe Feld I).
3. Mangelnde Einheitlichkeit	der Erfindung (siehe Feld II).	
Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfin	dung	
X   wird der vom Anmelder eing	gereichte Wortlaut genehmigt.	
wurde der Wortlaut von der	Behörde wie folgt festgesetzt:	
Hinsichtlich der <b>Zusammenfassung</b>		
wurde der Wortlaut nach Re	gereichte Wortlaut genehmigt. gel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassu e innerhalb eines Monats nach dem Datum der A ellungnahme vorlegen.	
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen	st mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen	: Abb. Nr
wie vom Anmelder vorgesch	nlagen	keine der Abb.
weil der Anmelder selbst ke	ine Abbildung vorgeschlagen hat.	
weil diese Abbildung die Erl	indung besser kennzeichnet.	

I

# VERTRAGER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

# **PCT**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeiche	en des Anmelders oder Anwalts	WEITERES	siehe Mitteilu	ng über die Übermittlung des internationalen
9572-BI	OTECON	VORGEHEN	Hecherchenbe	erichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit chstehender Punkt 5
j.	les Aktenzeichen 98/ 05738	Internationales Ann (Tag/Monat/Jahr)	neldedatum	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr
Anmelder	90/ 05/38	09/09	/1998	09/09/1997
Dieser intern	N GESELLSCHAFT FÜR	rda von dar Internation		hörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß
	ermittelt. Eine Kopie wird dem I ationale Recherchenbericht um		·	
X	Darüber hinaus liegt ihm je	weils eine Kopie der in	Blätt diesem Bericht ger	er. nannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.
	age des Berichts			
a. Hin: durc			aritor diesem i dilk	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	3-1-11014011		örde eingereichten Übersetzung der internationalen
b. Hins Rec	sichtlich der in der internationale herche auf der Grundlage des t in der internationalen Anme			i/oder Aminosäuresequenz ist die internationale as
	zusammen mit der internati			orm eingereicht worden ist.
X	bei der Behörde nachträglic	h in schriftlicher Form e	ingereicht worden	ist.
X	bei der Behörde nachträglic	h in computerlesbarer F	orm eingereicht w	orden ist.
X	•		naasgent, warde vi	protokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der orgelegt.
	Die Erklärung, daß die in co wurde vorgelegt.	mputerlesbarer Form er	rfaßten Information	en dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen,
2.	Bestimmte Ansprüche hat	oen sich als nicht rech	erchierbar erwies	sen (sjehe Feld I)
3.	Mangelnde Einheitlichkeit	der Erfindung (siehe F	eld II).	
	ch der <b>Bezeichnung der Erfin</b>	-		
X	wird der vom Anmelder eing			
	wurde der Wortlaut von der f	Behörde wie folgt festge	setzt:	
i. Hinsichtlic	ch der <b>Zusammenfassung</b>			
X	Recherchenberichts eine Ste	gel 38.2b) in der in Feld innerhalb eines Monats Ilungnahme vorlegen.	III angegebenen F nach dem Datum	assung von der Behörde festgesetzt. Der der Absendung dieses internationalen
. Folgende	Abbildung der Zeichnungen is	t mit der Zusammenfass	sung zu veröffentlic	chen: Abb. Nr
	wie vom Anmelder vorgeschl	agen		keine der Abb.
片	weil der Anmelder selbst kein			
1 1	weil diese Abbildung die Erfin	dung besser kennzeich	net.	

A. KLA	ASSIFIZI	ERUNG DES A	NMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK	6	C12Q1/68	EDONGOGEGENSTANDES

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

# B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Wänrend der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ;JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4. Januar 1996 siehe Seite 40, Zeile 3 - Seite 41, Zeile 3; Ansprüche 28-30	1-4,9-22
ZHU Q ET AL: "Detection of Salmonella typhi by polymerase chain reaction" JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, Bd. 80, 1966, Seiten 244-51, XP002096352 siehe das ganze Dokument	1-4,9-22
	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV; JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4. Januar 1996 siehe Seite 40, Zeile 3 - Seite 41, Zeile 3; Ansprüche 28-30  ZHU Q ET AL: "Detection of Salmonella typhi by polymerase chain reaction" JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, Bd. 80, 1966, Seiten 244-51, XP002096352

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :	
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	Emndung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-	"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen, Anmeldedatum, aber nach	erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden  "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung milt einer oder mehrren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
12. März 1999	29/03/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2	Bevollmächtigter Bediensteter
NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Osborne, H

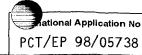
Siehe Anhang Patentfamilie

# INTERNATIONALER CHERCHENBERICHT

Initionales Aktenzeichen
PCT/EP 98/05738

C.(Fortsetz	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	Er 98/05/38
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teil	e Betr. Anspruch Nr.
Y	KUR J ET AL: "Identification of Pseudomonas aeruginosa on the basis of polymerase chain reaction amplified DNA spacer polymorphism" ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA, Bd. 44, Nr. 2, 1995, Seiten 111-7, XP002096353 siehe Zusammenfassung und Diskussion	1-4,9-22
Y	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30. Oktober 1996 siehe das ganze Dokument	1-4,9-22
r	EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4. Oktober 1989 siehe das ganze Dokument	1
(	EP 0 314 294 A (GENE TRAK SYSTEMS) 3. Mai 1989 siehe Seite 3, Zeile 50 - Seite 5	1
		·

# INTENTIONAL SEARCH REPORT



Patent doc		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 96002	98 A	04-01-1996	AU BR CA CZ EP JP	2924695 A 9508101 A 2193101 A 9603819 A 0769068 A 10501976 T	19-01-1996 30-12-1997 04-01-1996 15-04-1998 23-04-1997 24-02-1998
EP 07399	988 A	30-10-1996	DE JP	19515891 A 9107998 A	31-10-1996 28-04-1997
EP 03356	33 A	04-10-1989	AT DE DE JP US	122103 T 68922428 D 68922428 T 2150300 A 5658726 A	15-05-1995 08-06-1995 25-01-1996 08-06-1990 19-08-1997
EP 03142	94 A	03-05-1989	US AT AU DE DE DK FI JP	5089386 A 110419 T 2213488 A 3851200 D 3851200 T 503888 A 884164 A 1304899 A	18-02-1992 15-09-1994 16-03-1989 29-09-1994 23-03-1995 13-03-1989 12-03-1989 08-12-1989



# EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 88 30 8820

	OCUMENTS CONS	DERED TO BE RE	FFAVIA	<u> </u>	
ategory		th indication, where appropriate, evant passages		elevant o claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5)
Х	J. ASSOC. OFF. ANAL. CH 669-673; J.D. KLINGER et a nucleic acid hybridization a * Whole article *	al.: "Comparative studies of	J ,	2,8,9, ,14	C 12 Q 1/68 C 12 Q 1/04 // C 07 H 21/02
Α	IDEM		15	,16	
Α	JOURNAL OF GENERAL N pages 543-551, SGM, GB; netic position of Streptcoco * Whole article *	W. LUDWIG et al.: "The phy	' 1	16	
Α	APP. ENVIRON. MICROBIC 2256-2259, American Socie et al.: "Detection of hemoly using DNA colony hybridiza * Whole article *	ety for Microbiology; A.R. Datic Listeria monocytogenes	ATTA	15,16	
P,A	FR-A-2 616 808 (WASHIN SEARCH FOUNDATION) * Pages 15,16; claims 1-9 *	GTON STATE UNIV. RE-	1,	15,16	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.5)
					C 12 Q
	The present search report has	been drawn up for all claims			
	Place of search	Date of completion of sea	rch		Examiner
Y: A: O:	The Hague  CATEGORY OF CITED DOCE particularly relevant if taken alone particularly relevant if combined wid document of the same catagory technological background non-written disclosure intermediate document	h another i	the filing of cocument document	ate cited in th cited for o	OSBORNE H.H.  ent, but published on, or after e application ther reasons patent family, corresponding

# INTERNATIONALEF CHERCHENBERICHT

Ir. .donales Aktenzeichen
PCT/EP 98/05738

a. KLA IPK	ssifiz 6	ERUNG C12Q1	DES ANMEL	.DUNGSGE	ENSTANDES	

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

### B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  $IPK \ 6 \ C12Q$ 

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

Kategorie°	Description der Voröffentlichung geweit erfenderlich unter Annahe der in Betrecht leuwe auch Teile	D. 4. A
varegone.	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ; JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4. Januar 1996 siehe Seite 40, Zeile 3 - Seite 41, Zeile 3; Ansprüche 28-30	1-4,9-22
Y	ZHU Q ET AL: "Detection of Salmonella typhi by polymerase chain reaction" JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, Bd. 80, 1966, Seiten 244-51, XP002096352 siehe das ganze Dokument/	1-4,9-22

ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann atlein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist  Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
12. März 1999	29/03/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2	Bevollmächtigter Bediensteter
NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Osborne, H

1

Siehe Anhang Patentfamilie

# INTERNATIONALER CHERCHENBERICHT

Int. onales Aktenzeichen
PCT/EP 98/05738

	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
(ategorie <sup>3</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommend	den Teile Betr. Anspruch Nr.
Y	KUR J ET AL: "Identification of Pseudomonas aeruginosa on the basis of polymerase chain reaction amplified DNA spacer polymorphism" ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA, Bd. 44, Nr. 2, 1995, Seiten 111-7, XP002096353 siehe Zusammenfassung und Diskussion	1-4,9-22
Y	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30. Oktober 1996 siehe das ganze Dokument	1-4,9-22
Y	EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4. Oktober 1989 siehe das ganze Dokument	1
Y	EP 0 314 294 A (GENE TRAK SYSTEMS) 3. Mai 1989 siehe Seite 3, Zeile 50 - Seite 5	1
1		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

.iational Application No PCT/EP 98/05738

- AND DESCRIPTION OF THE PROPERTY OF THE PARTY OF THE PAR

	ent document in search report		Publication date	1	Patent family member(s)	Publication date
WO	9600298	Α	04-01-1996	AU	2924695 A	19-01-1996
				BR	9508101 A	30-12-1997
				CA	2193101 A	04-01-1996
				CZ	9603819 A	15-04-1998
				EP	0769068 A	23-04-1997
				JP	10501976 T	24-02-1998
EP	0739988	Α	30-10-1996	DE	19515891 A	31-10-1996
				JP	9107998 A	28-04-1997
EP	0335633	A	04-10-1989	AT	122103 T	15-05-1995
				DE	68922428 D	08-06-1995
				DE	68922428 T	25-01-1996
				JP	2150300 A	08-06-1990
				US	5658726 A	19-08-1997
ÉP	0314294	A	03-05-1989	US	5089386 A	18-02-1992
				ΑT	110419 T	15-09-1994
				AU	2213488 A	16-03-1989
				DE	3851200 D	29-09-1994
				DE	3851200 T	23-03-1995
				DK	503888 A	13-03-1989
				FΙ	884164 A	12-03-1989
				JP	1304899 A	08-12-1989



### From the INTERNATIONAL BUREAU

# **PCT**

### **NOTIFICATION OF ELECTION**

(PCT Rule 61.2)

United States Patent and Trademark

Office (Box PCT) Crystal Plaza 2 Washington, DC 20231 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing (day/month/year) 18 May 1999 (18.05.99)	in its capacity as elected Office
International application No. PCT/EP98/05738	Applicant's or agent's file reference 9572-BIOTECON
International filing date (day/month/year) 09 September 1998 (09.09.98)	Priority date (day/month/year) 09 September 1997 (09.09.97)
Applicant BERGHOF, Kornelia et al	

, , ,	oncorn.
	BERGHOF, Kornelia et al
1.	The designated Office is hereby notified of its election made:
٠.	The designated office is hereby nothied of its election made.
	X in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
	09 March 1999 (09.03.99)
	in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2.	The election X was
	was not
	made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

R. E. Stoffel

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

# **PCT**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES S	iehe Mitteilung über d	ie Übermittlung des internationalen	
9572-BIOTECON	VORGEHEN z	Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmelded (Tag/Monat/Jahr)	atum	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tay/Monat/Jahr)	
PCT/EP 98/05738	09/09/199	8	09/09/1997	
Annielder	<u> </u>	<u> </u>	02.02.122.	
BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR E	BIOTECHNOLOGISCH	.et al		
Dieser Internationale Recherchenbericht wurd Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Int	le von der Internationalen F ternationalen Büro übermitt	lecherchenbehörde er	rstellt und wird dem Anmelder gemäß	
	ornationalori baro aberrinte			
Dieser internationale Recherchenbericht umfa		Blätter.		
X Darüber hinaus liegt ihm jew	veils eine Kopie der in diese	m Bericht genannten	Unterlagen zum Stand der Technik bei.	
Grundlage des Berichts			<del></del>	
a. Hinsichtlich der <b>Sprache</b> ist die inter	rnationale Becherche auf d	er Grundlage der inter	rnationalan Anmoldung in der Sereche	
durchgeführt worden, in der sie eing	ereicht wurde, sofern unter	diesem Punkt nichts	anderes angegeben ist.	
Die internationale Recherch Anmeldung (Regel 23.1 b))	e ist auf der Grundlage eine durchgeführt worden.	er bei der Behörde ein	gereichten Übersetzung der internationalen	
b. Hinsichtlich der in der internationale	n Anmeldung offenbarten N	ucleotid- und/oder A	Aminosäuresequenz ist die internationale	
Recherche auf der Grundlage des S in der internationalen Anmel	iequenzprotokolls durchgefi	ihrt worden, das	•	
zusammen mit der internation			savalah kunandan iak	
X bei der Behörde nachträglich		-	gereicht worden ist.	
X bei der Behörde nachträglich			<b>^</b>	
Die Erklärung, daß das nach	nträglich eingereichte schrift	liche Sequenzprotoko	oll nicht über den Offenbarungsgehalt der	
internationalen Anmeldung i	m Anmeldezeitpunkt hinaus	sgeht, wurde vorgeleg	t.	
wurde vorgelegt.	mputerlesbarer Form erfaßl	en Informationen dem	n schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen.	
2. Bestimmte Ansprüche hab	en sich als nicht recherc	nierbar erwiesen (sie	ehe Feld I)	
3. Mangelnde Einheitlichkeit				
Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfin	=			
wird der vom Anmelder eing				
wurde der Wortlaut von der l	Benorde wie folgt festgeset	zt:	<u> </u>	
- 10				
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung	analaka ak			
wird der vom Anmelder eing wurde der Wortlaut nach Be			g von der Behörde festgesetzt. Der	
Anmelder kann der Behörde Recherchenberichts eine Ste	innerhalb eines Monats na	ch dem Datum der Ab	g von der Benorde lesigesetzt. Der osendung dieses internationalen	
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen is	st mit der Zusammenfassun	g zu veröffentlichen; ,	Abb. Nr	
wie vom Anmelder vorgesch			keine der Abb.	
weil der Anmelder selbst kei	ne Abbildung vorgeschlage	n hat.		
weil diese Abbildung die Erfi	ndung besser kennzeichne	<b>:.</b>		



# A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

### B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C120

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Υ .	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ;JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4. Januar 1996 siehe Seite 40, Zeile 3 - Seite 41, Zeile 3; Ansprüche 28-30	1-4,9-22
Y	ZHU Q ET AL: "Detection of Salmonella typhi by polymerase chain reaction" JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, Bd. 80, 1966, Seiten 244-51, XP002096352 siehe das ganze Dokument	1-4,9-22
		<u> </u>

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie
ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundellegenden Prinzips oder der ihr zugrundellegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  12. März 1999	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 29/03/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Osborne, H
	1



			8/05/38
	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe de in Betracht komn	nenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KUR J ET AL: "Identification of Pseudomonas aeruginosa on the basis of polymerase chain reaction amplified DNA spacer polymorphism" ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA, Bd. 44, Nr. 2, 1995, Seiten 111-7, XP002096353 siehe Zusammenfassung und Diskussion		1-4,9-22
·Y	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30. Oktober 1996 siehe das ganze Dokument		1-4,9-22
Υ	EP 0 335 633 A (INTÉGRATED GENETICS INC) 4. Oktober 1989 siehe das ganze Dokument		1
Y	EP 0 314 294 A (GENE TRAK SYSTEMS) 3. Mai 1989 siehe Seite 3, Zeile 50 - Seite 5		1
	·		
	·		

1

PCT/EP 98/05738

	echerchenberich rtes Patentdoku		Datum der Veröffentlichung		litglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO	9600298	Α.	04-01-1996	AU BR CA CZ EP JP	2924695 A 9508101 A 2193101 A 9603819 A 0769068 A 10501976 T	19-01-1996 30-12-1997 04-01-1996 15-04-1998 23-04-1997 24-02-1998
EP	0739988	A	30-10-1996	DE JP	19515891 A 9107998 A	31-10-1996 28-04-1997
EP 	0335633	A	04-10-1989	AT DE DE JP US	122103 T 68922428 D 68922428 T 2150300 A 5658726 A	15-05-1995 08-06-1995 25-01-1996 08-06-1990 19-08-1997
EP	0314294	А	03-05-1989	US AT AU DE DE DK FI JP	5089386 A 110419 T 2213488 A 3851200 D 3851200 T 503888 A 884164 A 1304899 A	18-02-1992 15-09-1994 16-03-1989 29-09-1994 23-03-1995 13-03-1989 12-03-1989 08-12-1989

# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07H 21/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: A2

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. März 1999 (18.03.99)

WO 99/12949

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/05738

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. September 1998 (09.09.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 39 611.9

9. September 1997 (09.09.97)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTE-CON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGHOF, Kornelia [DE/DE]; Rhodeländerweg 85, D-12355 Berlin (DE). GASCH, Alexander [DE/DE]; Steegerstrasse 71, D-13359 Berlin (DE). BRÄUER, Anja [DE/DE]; Residenzstrasse 100, D-13409 Berlin (DE). GRÖNEWALD, Cordt [DE/DE]; Elberfelder Strasse 12, D-10555 Berlin (DE). WILBORN, Freimut [DE/DE]; Neue Kantstrasse 9, D-14057 Berlin (DE). ROLFS, Amdt [DE/DE]; Schröderstrasse 39, D-18055 Rostock (DE).
- (74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

### Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: AMINO ACID SEQUENCES AND METHOD FOR ISOLATING BACTERIES FROM THE TYPE GENUS PSEUDOMONAS
- (54) Bezeichnung: NUCLEINSÄURE-SEQUENZEN UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON BAKTERIEN DER GATTUNG **PSEUDOMONAS**

### (57) Abstract

The invention relates to one or more nucleic acid molecule and a method for isolating bacteries from the type genus pseudomonas, especially pseudomonas aeruginosa. It also relates to a test kit for implementing said method.

### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere Pseudomonas aeruginosa. Femer ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.

Absender:

MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

BOETERS, Hans D.
BOETERS & BAUER
Bereiteranger 15
D-81541 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN

1 1. Nov. 1999

BOETERS & BAUER
Patentanwälte

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum

(Tag/Monat/Jahr)

\_1 0, 11, 99

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

9572

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05738

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 09/09/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

09/09/1997

Anmelder

BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECH... et al.

- 1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- 2. Eine Kopie des Berichts wird gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- 3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amts wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

### 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

9))

Europäisches Patentamt D-80298 München

Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d

Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Danti, B

Tel. +49 89 2399-8161







# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM **GEBIET DES PATENTWESENS**

# **PCT**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeiche	n des Anmelders oder Anwalts	<u></u>	alaha Missa	
9572		WEITERES VORG		ung über die Übersendung des internationalen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
International	es Aktenzeichen	Internationales Anmelde	datum <i>(Tag/Monat/Jahr)</i>	Prioritätsdatum <i>(Tag/Monat/Tag)</i>
PCT/EP98	3/05738	09/09/1998		09/09/1997
International C07H21/0	e Patentklassification (IPK) oder O	nationale Klassifikation un	d IPK	
Anmelder				
BIOTECO	N GESELLSCHAFT FÜR	BIOTECH et al.		
1. Dieser Behörd	internationale vorläufige Prü le erstellt und wird dem Anm	ifungsbericht wurde von elder gemäß Artikel 36	der mit der internatio übermittelt.	nale vorläufigen Prüfung beauftragte
2. Dieser	BERICHT umfaßt insgesam	t 4 Blätter einschließlic	h dieses Deckblatts.	
un Be	d/oder Zeichnungen, die geä	indert wurden und diese ichtigungen (siehe Rege	em Bericht zuarunde I	ter mit Beschreibungen, Ansprüchen iegen, und/oder Blätter mit vor dieser : 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
3. Dieser	Bericht enthält Angaben zu 1	folgenden Punkten:		
ı	☐ Grundlage des Berichts	5		
11	☐ Priorität			
111	☐ Keine Erstellung eines	Gutachtens über Neuhe	eit, erfinderische Tätig	keit und gewerbliche Anwendbarkeit
IV	Mangelnde Einheitlichk	eit der Erfindung		
V	Begründete Feststellun gewerbliche Anwendba	g nach Artikel 35(2) hin irkeit; Unterlagen und E	sichtlich der Neuheit, rklärungen zur Stützu	der erfinderische Tätigkeit und der ng dieser Feststellung
VI	☐ Bestimmte angeführte l		•	
VII		internationalen Anmeld	ung	
VIII	☐ Bestimmte Bemerkunge	en zur internationalen A	nmeldung	
Datum der Ei	nreichung des Antrags		Datum der Fertigstellun	ng dieses Berichts
00/00/400	,		9 0. 11.	~

Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München

von Ballmoos, P Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d

Fax: +49 89 2399 - 4465

Tel. Nr. +49 89 2399 8174

Bevollmächtigter Bediensteter



09/03/1999





# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER **PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05738

l. Grundlag	e des	<b>Berichts</b>
-------------	-------	-----------------

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach

	Artike nicht	el 14 hin vorgeleg beigefügt, weil s	gt wurden, ge ie keine Ände	lten im erunge	Rahmen die n enthalten.):	ses Berichts	als "ursprünglich ein	gereicht" und sind ihm	
	Besc	hreibung, Seite	n:						
	1-3,5	-20 🗸	ursprünglich	ne Fas	sung				
	4,4a		eingegange	n am		20/10/1999	mit Schreiben vom	20/10/1999	
	Pater	ntansprüche, Nr	.:			ι			
	1-18	V	eingegange	n am		20/10/1999	mit Schreiben vom	20/10/1999	
2.	Aufgr	und der Änderun	gen sind folge	ende L	Interlagen for	tgefallen:			
		Beschreibung, Ansprüche, Zeichnungen,	Seiten: Nr.: Blatt:						
3.	а	Dieser Bericht ist on ngegebenen Grü ingereichten Fas	muen nach A	uπassι	ing der Beho	rde über den	erungen erstellt word Offenbarungsgehalt	en, da diese aus den in der ursprünglich	
1.	Etwai	ge zusätzliche Be	emerkungen:						
	s	iehe Beiblatt							
/.	Begrü gewei	indete Feststelli blichen Anwend	ung nach Art dbarkeit; Uni	ikel 35 terlage	5(2) hinsichti en und Erklä	ich der Neul rungen zur S	heit, der erfinderisc Stützung dieser Fesi	hen Tätigkeit und der tstellung	
	Festst					Ū		<b>.</b>	
	Neuhe	eit (N)		Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-18			
	Erfinde	erische Tätigkeit	(ET)	Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-18			
	Gewer	bliche Anwendba	arkeit (GA)	Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-18			





# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05738

Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

# VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist: siehe Beiblatt

# VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt





# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05738

### Teil I

Seiten, die am 28.12.1998 eingereicht wurden: Gemäss Regel 13ter.1(f) PCT werden Sequenzprotokolle, die nach dem Anmeldetag eingereicht und nicht als Änderungen gekennzeichnet wurden, nicht als Teil der Bescheibung betrachtet und sind diesem Bescheid auch nicht als Annex beigefügt.

### Teil V

Alle vorliegenden Ansprüche beziehen sich auf spezifische Nucleinsäuresequenzen, welche den Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* gestatten. Die beanspruchten Nucleinsäuresequenzen sind im Stand der Technik weder offenbart noch nahegelegt worden. Ausserdem haben die gewählten Sequenzen den Effekt, dass sie eine unerwartet grosse Auswahl verschiedener Stämme der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* nachweisen können, ohne falsch positive Resultate mit Bakterien anderer Spezies oder Genera zu ergeben (siehe dazu Tabelle 1).

Die Ansprüche 1-18 erfüllen somit die Erfordernisse des PCT in bezug auf Neuheit und erfinderische Tätigkeit (Art. 33(2) und (3) PCT).

### Teil VII

Die Beschreibung steht nicht, wie in Regel 5.1 a) iii) PCT vorgeschrieben, in Einklang mit den Ansprüchen.

### Teil VIII

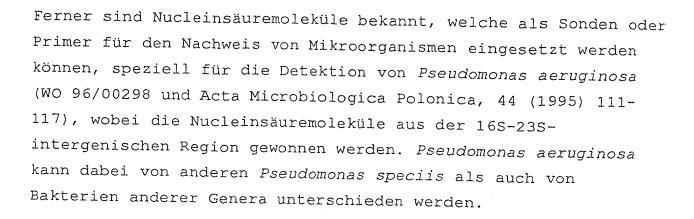
Das funktionelle Merkmal "wobei das Nucleinsäuremolekül den Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* gestattet" hätte in Anspruch 5 so eingefügt werden sollen, dass klar ersichtlich ist, dass es sich auf alle Varianten (i)-(iiii) bezieht (Art. 6 PCT).

Das beschriebene Multiplex-PCR-System bietet zudem wegen der hohen Konservierung der oprI und oprL-Gene wohl kaum die Möglichkeit, durch z.B. Einsatz verschiedener Sonden im Anschluß an die PCR-Reaktion, auch andere klinisch relevante Spezies der Gattung Pseudomonas nachzuweisen, wie z.B. Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas putida oder Pseudomonas stutzeri.

Ziel der hier dargestellten Erfindung war die Etablierung von Nucleinsäuresequenzen, deren Einsatz als Primer und/oder Sonden eine möglichst vollständige Erfassung aller Vertreter der Spezies Pseudomonas aeruginosa sicherstellt. Ein weiteres Ziel der Erfindung war das Auffinden eines Genom-Bereiches, der innerhalb verschiedener Spezies der Gattung Pseudomonas ausreichend hohe Sequenz-Variabilität aufweist, um optional auch den Nachweis anderer Spezies der Gattung Pseudomonas zu ermöglichen, z.B. durch Einsatz verschiedener Varianten von Primern und/oder Sonden in der PCR bzw. im Anschluß an die PCR.

Je nach Größe der zu detektierenden Gruppe von Mikroorganismen und evolutionäre Verwandtschaft (Ähnlichkeit) von abzugrenzenden (nicht zu erfassenden) Mikroorganismen erfordert ein auf differentiellen DNA-Sequenzen basierender Nachweis sehr umfangreiche Vorarbeiten, um jeweils geeignete DNA-Sequenzen mit der gewünschten Spezifität zu finden. Die hier dargelegte Erfindung betrifft solche DNA-Sequenzen, mit denen der Schnellnachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere von Pseudomonas aeruginosa möglich ist.

### Beschreibung der Erfindung



Auch ist es bekannt, daß die 23S-5S-intergenische Region für Bakterien, bei denen es sich nicht um *Pseudomonas-speciis* handelt, erfolgreich zur Isolierung von speciis- und generaspezifischen Nucleinsäuremolekülen verwendet werden kann (J. Applied Bakteriology, 80 (1996) 244-251 und EP 0 739 988).

# Beschreibung der Erfindung

Gemäß einer Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegene Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst,

### Patentansprüche 1 bis 18 (Artikel 34 Kap. II PCT)

- 1. Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.
- 2. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 verkürzter Sequenz, und zwar der Sequenz des Bereiches oder im Bereich der Nukleotidpositionen 12 bis 131.
- 3. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 verkürzter Sequenz, nämlich
- (i) der SEQ ID NO 3 oder

- (ii) der SEQ ID NO 4 oder
- (iii) der SEQ ID NO 5 oder
- (iv) der zu (i), (ii) und (iii) jeweils komplementären Sequenz.
- 4. Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 2 oder der hierzu komplementären Sequenz.
- 5. Nucleinsäuremolekül, dadurch *gekennzeichnet*, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette
- (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
- (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
- (iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder

- (iv) zu mindestens 90 % mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist, wobei das Nucleinsäuremolekül den Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas gestattet.
- 6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, dadurch *gekennzeichnet*, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotide lang ist.
- 7. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.
- 8. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß es
- (i) als DNA oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA oder
- (iii) als PNA vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

- 9. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch modifiziert ist, daß bis zu 20 % der Nukleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.
- 10. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch oder

zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert ist, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

- 11. Ein oder mehrere Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in Gegenwart fakultativer Hilfsstoffe und in Form eines Kits für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*.
- 12. Verwendung ein oder mehrerer Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 oder in Form eines Kits gemäß Anspruch 11 zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* angehören.
- 13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* umfaßt oder durch diese Stämme gebildet wird.
- 14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* ausschließlich um *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme handelt.

- 15. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.
- 16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch *gekennzeichnet*, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt.
- 17. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 unterscheidet.
- 18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch *gekennzeichnet*, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 1 unterscheidet.

# WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM

Internationale Anmeldung veröffentlicht nach dem vertrag über die INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: C12Q 1/68

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/12949

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

18. März 1999 (18.03.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/05738

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. September 1998 (09.09.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 39 611.9

9. September 1997 (09.09.97)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTE-CON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGHOF, Kornelia [DE/DE]; Rhodeländerweg 85, D-12355 Berlin (DE). GASCH, Alexander [DE/DE]; Steegerstrasse 71, D-13359 Berlin (DE). BRÄUER, Anja [DE/DE]; Residenzstrasse 100, D-13409 Berlin (DE). GRÖNEWALD, Cordt [DE/DE]; Elberfelder Strasse 12, D-10555 Berlin (DE). WILBORN, Freimut [DE/DE]; Neue Kantstrasse 9, D-14057 Berlin (DE). ROLFS, Arndt [DE/DE]; Schröderstrasse 39, D-18055 Rostock (DE).

(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 27. Mai 1999 (27.05.99)

(54) Title: AMINO ACID SEQUENCES AND METHOD FOR ISOLATING BACTERIES FROM THE TYPE GENUS PSEUDOMONAS

(54) Bezeichnung: NUCLEINSÄURE-SEQUENZEN UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON BAKTERIEN DER GATTUNG **PSEUDOMONAS** 

### (57) Abstract

The invention relates to one or more nucleic acid molecule and a method for isolating bacteries from the type genus pseudomonas, especially pseudomonas aeruginosa. It also relates to a test kit for implementing said method.

### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere Pseudomonas aeruginosa. Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ational Application No PCT/EP 98/05738

A. CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68		
According to	o international Patent Classification (IPC) or to both national classific	cation and IPC	
	SEARCHED		
Minimum do	ocumentation searched (classification system followed by classification C12Q	tion symbols)	
- - - - - - - - - - - - - - - - - - -	tion searched other than minimum documentation to the extent that	such documents are included in the fields so	earched
Electronic a	ata base consulted during the international search (name of data b	ase and, where practical, search terms used	()
C. DOCUMI	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the re	elevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ; GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HE		1-4,9-22
	H) 4 January 1996		
	see page 40, line 3 - page 41, l claims 28-30	ine 3;	
Υ	ZHU Q ET AL: "Detection of Salm		1-4,9-22
	typhi by polymerase chain reacti JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY,	on"	
	vol. 80, 1966, pages 244-51, XPO	02096352	
	see the whole document		
		and / Free rate	
			<b>\$</b>
X Funt	her documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed	In annex.
° Special ca	stegories of cited documents :		
	ent defining the general state of the lart which is not	"T" later document published after the inte or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or th	the application but
"E" earlier	dered to be of particular relevance document but published on or after the International	invention  "X" document of particular relevance; the	
"L" docume	ent which may throw doubts on priority claim(s) or	cannot be considered novel or canno involve an inventive step when the de	t be considered to
citatio	is cited to establish the publication date of another n or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the cannot be considered to involve an in	ventive step when the
other	ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means	document is combined with one or ments, such combination being obvious	
"P" docume	ent published prior to the international filing date but han the priority date claimed	in the art. "%" document member of the same paten	t lamily
Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of the international se	earch report
1	2 March 1999	29/03/1999	
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2	Authorized officer	
	NL - 2280 HV Ríjswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,	Osborne H	
1	Fav: (+31.70) 340-3016	i USDOL∏€. ⊓	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 98/05738

C.(Continu	ALIONI DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	PCT/EP 98/05738		
Category -	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	KUR J ET AL: "Identification of Pseudomonas aeruginosa on the basis of polymerase chain reaction amplified DNA spacer polymorphism" ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA. vol. 44, no. 2, 1995, pages 111-7, XP002096353 See abstract and discussion	1-4,9-22		
Y	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30 October 1996 see the whole document	1-4,9-22		
<b>r</b>	EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4 October 1989 see the whole document	1		
,	EP 0 314 294 A (GENE TRAK SYSTEMS) 3 May 1989 see page 3, line 50 - page 5	1		
ļ				

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

in. ational Application No PCT/EP 98/05738

Patent document cited in search repor	t	Publication date		Patent ramily member(s)	Publication date
WO 9600298	А	04-01-1996	AU BR CA CZ EP JP	2924695 A 9508101 A 2193101 A 9603819 A 0769068 A 10501976 T	19-01-1996 30-12-1997 04-01-1996 15-04-1998 23-04-1997 24-02-1998
EP 0739988	Α	30-10-1996	DE JP	19515891 A 9107998 A	31-10-1996 28-04-1997
EP 0335633	A	04-10-1989	AT DE DE JP US	122103 T 68922428 D 68922428 T 2150300 A 5658726 A	15-05-1995 08-06-1995 25-01-1996 08-06-1990 19-08-1997
EP 0314294	А	03-05-1989	US AT AU DE DE DK FI JP	5089386 A 110419 T 2213488 A 3851200 D 3851200 T 503888 A 884164 A 1304899 A	18-02-1992 15-09-1994 16-03-1989 29-09-1994 23-03-1995 13-03-1989 12-03-1989 08-12-1989

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

in ationales Aktenzeichen

		PCT	/EP 98/05738
A. KLASSI IPK 6	IFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C 1201/68		
*******	32247, 33		
Nach der in	iternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klas	ssifikation und der IPK	
B. RECHE	ACHIERTE GEBIETE		
Recherchie	rter Mindestprufstoff. (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol C12Q	ole)	
Recherchie	de aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, so	weit diese unter die recherchie	rten Gebiete fallen
Wahreng de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (N	ame der Datenbank und evti.	verwendete Suchbegriffe)
		a a a	,, , , , , , , , , , , , , , , , ,
C. ALS WE	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	e der in Betracht kommenden T	Teile Betr. Anspruch Nr.
	110 05 00000 A (INNOSENETICS AND IN	AAINEO	1.40.00
Y	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ;J GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEU		1-4,9-22
ŀ	H) 4. Januar 1996		
	siehe Seite 40, Zeile 3 - Seite 4 3; Ansprüche 28-30	l, Zeile	
Y	ZHU Q ET AL: "Detection of Salmo typhi by polymerase chain reactio		1-4,9-22
	JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY,		
	Bd. 80, 1966, Seiten 244-51, XP00 siehe das ganze Dokument	2096352	
		,	
	_	/	
TV Wait	l tere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu	W	( and in
entn	ehmen	X Siehe Anhang Patent	
A" Veröffe	a Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : ntlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, licht als besonders bedeutsam anzusehen ist	oder dem Prioritätsdatum	die nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist und mit der , sondern nur zum. Verstandnis des der
"E" älteres	Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Idedatum veröffentlicht worden ist	Erfindung zugrundeliegen Theorie angegeben ist	den Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden
"L" Veröffer	ntlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-	kann allein aufgrund diese	nderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung er Veröffentlichung nicht als neu oder auf
ander	en im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	"Y" Veröffentlichung von besor	nderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung ischer Tätigkeit beruhend betrachtet
	führt) snitichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	werden, wenn die Veröffe Veröffentlichungen dieser	ntlichung mit einer oder mehreren anderen Kategorie in Verbindung gebracht wird und
"P" Veröffe	ontlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	"&" Veröffentlichung, die Mitgli	n Fachmann naheliegend ist ed derseiben Patenifamilie ist
Datum des	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des intern	ationalen Recherchenberichts
1	2. März 1999	29/03/1999	
Name und f	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehorde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2	Bevollmächtigter Bediens	teter
	NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,	Osborne, H	
1	Fax: (+31-70) 340-3016	usporne, n	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inc. liationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/05738

.(Fortsetz	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	98/05738
tegorie:	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	1 Pote Apagainst Aug
	i die Angebe der in deutschrikkinflienden Telle	Betr. Anspruch Nr.
Y	KUR J ET AL: "Identification of Pseudomonas aeruginosa on the basis of polymerase chain reaction amplified DNA spacer polymorphism" ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA, Bd. 44, Nr. 2, 1995, Seiten 111-7. XP002096353 siehe Zusammenfassung und Diskussion	1-4,9-22
	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30. Oktober 1996 siehe das ganze Dokument	1-4,9-22
	EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4. Oktober 1989 siehe das ganze Dokument	1
	EP 0 314 294 A (GENE TRAK SYSTEMS) 3. Mai 1989 siehe Seite 3, Zeile 50 - Seite 5	1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veroffentlichungen, die zur seiben Patentfamilie gehoren

im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument WO 9600298 A	Catum der veröffentlichung	AU 292469 BR 950810 CA 219310	Datum der Veröffentlichung  5 A 19-01-1996 1 A 30-12-1997
EP 0739988 A  EP 0335633 Δ	30-10-1996	CZ 9603819 EP 0769068 JP 10501976 DE 19515891 JP 9107998	04-01-1996 15-04-1998 17 23-04-1997 24-02-1998 A 31-10-1996
EP 0314294	04-10-1989 03-05-1989	AT 122103 DE 68922428 DE 68922428 JP 2150300 A US 5658726 A	7 15-05-1995 0 08-06-1995 1 25-01-1996
		US 5089386 A AT 110419 T AU 2213488 A DE 3851200 T DK 503888 A FI 884164 A JP 1304899 A	18-02-1992 15-09-1994 16-03-1989 29-09-1994 23-03-1995 13-03-1989 12-03-1989 08-12-1989



## PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/12949 **A2** C07H 21/00 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. März 1999 (18.03.99)

PCT/EP98/05738 (21) Internationales Aktenzeichen:

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. September 1998 (09.09.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 39 611.9

9. September 1997 (09.09.97) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTE-CON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).

(72) Erfinder: und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGHOF, Kornelia [DE/DE]; Rhodeländerweg 85, D-12355 Berlin (DE). GASCH, Alexander [DE/DE]; Steegerstrasse 71, D-13359 Berlin (DE). BRÄUER, Anja [DE/DE]; Residenzstrasse 100, D-13409 Berlin (DE). GRÖNEWALD, Cordt [DE/DE]; Elberfelder Strasse 12, D-10555 Berlin (DE), WILBORN, Freimut [DE/DE]; Neue Kantstrasse 9, D-14057 Berlin (DE). ROLFS, Arndt [DE/DE]; Schröderstrasse 39, D-18055 Rostock (DE).
- (74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC. LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,

#### Veröffentlicht

SN, TD, TG).

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: AMINO ACID SEQUENCES AND METHOD FOR ISOLATING BACTERIES FROM THE TYPE GENUS PSEUDOMONAS'
- (54) Bezeichnung: NUCLEINSÄURE-SEQUENZEN UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON BAKTERIEN DER GATTUNG **PSEUDOMONAS**
- (57) Abstract

The invention relates to one or more nucleic acid molecule and a method for isolating bacteries from the type genus pseudomonas, especially pseudomonas aeruginosa. It also relates to a test kit for implementing said method.

### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere Pseudomonas aeruginosa. Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.

## LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL AM AT AU AZ BA BB BE BF BG BJ CA CF CG CH CI CM CV CZ DE DK	Albanien Armenien Österreich Australien Aserbaidschan Bosnien-Herzegowina Barbados Belgien Burkina Faso Bulgarien Benin Brasilien Belarus Kanada Zentralafrikanische Republik Kongo Schweiz Côte d'Ivoire Kamerun China Kuba Tschechische Republik Deutschland Dänemark Estland	ES FI FR GA GB GE GH GN GR HU IE II IS IT JP KE KG KP  KR LC LI LK LR	Spanien Finnland Frankreich Gabun Vereinigtes Königreich Georgien Ghana Guinea Griechenland Ungarn Irland Israel Island Italien Japan Kenia Kirgisistan Demokratische Volksrepublik Korea Republik Korea Kasachstan St. Lucia Liechtenstein Sri Lanka Liboria	LS LT LU LV MC MD MG MK ML MN MR MN NE NL NO NZ PL PT RO RU SD SE SG	Lesotho Litauen Luxemburg Lettland Monaco Republik Moldau Madagaskar Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien Mali Mongolei Mauretanien Malawi Mexiko Niger Niederlande Norwegen Neuseeland Polen Portugal Rumänien Russische Föderation Sudan Schweden Singapur	SI SK SN SZ TD TG TJ TM TR TT UA UG US VN YU ZW	Slowenien Slowakei Senegai Swasiland Tschad Togo Tadschikistan Turkmenistan Türkei Trinidad und Tobago Ukraine Uganda Vereinigte Staaten von Amerika Usbekistan Vietnam Jugoslawien Zimbabwe
--	---	---	---	--	---	--	--

Nucleinsäure-Sequenzen und Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas

Die Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle für *Pseudomonas*-Nachweis, einen Kit sowie deren Verwendungen.

## Allgemeiner Hintergrund der Erfindung

Das gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist ein weit-verbreitetes, für den Menschen pathogenes Bakterium, das vor allem für Neugeborene und abwehrgeschwächte Menschen ein hohes gesundheitliches Risiko darstellt. Neben seiner hohen klinischen Relevanz, der häufig vorhandenen Antibiotikaresistenzen und der Bildung von Toxinen, insbesondere des hochgiftigen Exotoxins A (Woods, D.E. and Iglewski, B.H., Rev. Infect. Dis. 5, 714-722 (1983), ist *Pseudomonas aeruginosa* einer der bedeutendsten, bakteriellen Verursacher von Lebensmittelvergiftungen. Für den Nachweis von

Pseudomonas aeruginosa werden mittels konventioneller Verfahren mindestens 4 Tage benötigt. Die Entwicklung schneller Nachweisverfahren von Pseudomonas aeruginosa in Lebensmitteln und klinischen Proben ist daher dringend erforderlich.

Für den routinemäßigen Einsatz zur Erfassung einzelner Mikroorganismen sind in den letzten Jahren eine Reihe neuer Methoden entwickelt worden. Hierzu zählen immunologische Verfahren, die auf dem Einsatz polyvalenter oder monoklonaler Antikörper beruhen und Verfahren, bei denen Nucleinsäure-Sonden zum Nachweis mittels Hybridisierung an keimspezifische Nucleinsäuren eingesetzt werden. Als weitere Methoden werden diejenigen Verfahren beschrieben, die auf einer spezifischen Nucleinsäure-Amplifikation basieren, mit oder ohne anschließende Bestätigungsreaktion durch Nucleinsäure-Hybridisierung. Eingesetzte Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren sind z.B. die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) [US Fatente 4,683,195; 4,683,202; und 4,965,188], die Ligase-Kettenreaktion [WO Veröffentlichung 89/09835], die "self-sustained sequence replication" [EP 329,822], das "transcription based amplification system" [EP 310,229] und das Q $\beta$  RNA-Replikase-System [US Patent 4,957,858].

Die genannten Verfahren auf Nucleinsäure-Basis sind so sensitiv, daß, anders als bei konventionellen mikrobiologischen Verfahren, eine langwierige Anreicherung des nachzuweisenden Mikroorganismus aus der zu untersuchenden Probe entfällt oder stark verkürzt werden kann. Eine Untersuchung auf An- oder Abwesenheit des jeweiligen Mikroorganismus ist daher bei Anwendung der genannten Verfahren auf Nucleinsäure-Basis in der Regel innerhalb eines Tages abgaschlossen. Insbesondere wenn für den Nachweis mittels konventioneller Verfahren mehrere Tage bis Wochen

benötigt werden, wird hierdurch eine erhebliche Zeitverkürzung erreicht.

Es sind verschiedene Verfahren auf PCR-Basis zum Nachweis von Pseudomonas aeruginosa beschrieben. Mittels Amplifikation einer 369 bp langen DNA-Region aus dem Exotoxin A-Gen konnte selektiv die Anwesenheit von Stämmen der Spezies Pseudomonas aeruginosa nachgewiesen werden [Khan et al. (1994), Appl. Environ. Microbiol. 60, 3739-3745]. Zwar wurden mit diesem PCR-System keine Bakterien anderer Spezies erfaßt, jedoch konnte nur bei 96% der insgesamt 130 getesteten Pseudomonas aeruginosa-Stämme ein Amplifikat beobachtet werden. Dieses PCR-System ist somit nur bedingt für die Etablierung eines Schnellverfahrens geeignet, mit dem die Anwesenheit aller Stämme von Pseudomonas aeruginosa zuverlässig nachgewiesen werden kann.

Mit Hilfe eines weiteren, kürzlich veröffentlichten, auf einer Multiplex-PCR basierenden Verfahrens gelang der selektive Nachweis von fluoreszierenden Pseudomonaden einerseits und Pseudomonas aeruginosa andererseits [De Vos et al (1997), J. Clin. Microbiol. 35, 1295-1299]. Jedes der insgesamt 150 getesteten Isolate von Pseudomonas aeruginosa konnte mit diesem Verfahren erfaßt werden. Nachteilig ist jedoch, daß das für die selektive Erfassung von Pseudomonas aeruginosa herangezogene oprL-Gen auch in anderen Spezies der Gattung Pseudomonas hochkonserviert ist. So sind die Aminosäuren, die im Bereich der Bindungsstellen der von Voss et al. verwendeten Primer kodiert werden, in Pseudomonas putida und Pseudomonas aeruginosa identisch. Der Nachweis von Pseudomonas aeruginosa beruht somit lediglich auf einigen wenigen unterschiedlichen Basenpaaren bedingt durch die Variation der dritten Position einzelner Aminosäurecodons. Dies birgt erfahrungsgemäß eine große Gefahr des Auftretens von falsch-positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen.

Das beschriebene Multiplex-PCR-System bietet zudem wegen der hohen Konservierung der oprI und oprL-Gene wohl kaum die Möglichkeit, durch z.B. Einsatz verschiedener Sonden im Anschluß an die PCR-Reaktion, auch andere klinisch relevante Spezies der Gattung Pseudomonas nachzuweisen, wie z.B. Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas putida oder Pseudomonas stutzeri.

Ziel der hier dargestellten Erfindung war die Etablierung von Nucleinsäuresequenzen, deren Einsatz als Primer und/oder Sonden eine möglichst vollständige Erfassung aller Vertreter der Spezies Pseudomenas aeruginosa sicherstellt. Ein weiteres Ziel der Erfindung war das Auffinden eines Genom-Bereiches, der innerhalb verschiedener Spezies der Gattung Pseudomenas ausreichend hohe Sequenz-Variabilität aufweist, um optional auch den Nachweis anderer Spezies der Gattung Pseudomenas zu ermöglichen, z.B. durch Einsatz verschiedener Varianten von Primern und/oder Sonden in der PCR bzw. im Anschluß an die PCR.

Je nach Größe der zu detektierenden Gruppe von Mikroorganismen und evolutionäre Verwandtschaft (Ähnlichkeit) von abzugrenzenden (nicht zu erfassenden) Mikroorganismen erfordert ein auf differentiellen DNA-Sequenzen basierender Nachweis sehr umfangreiche Vorarbeiten, um jeweils geeignete DNA-Sequenzen mit der gewünschten Spezifität zu finden. Die hier dargelegte Erfindung betrifft solche DNA-Sequenzen, mit denen der Schnellnachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere von Pseudomonas aeruginosa möglich ist.

## Beschreibung der Erfindung

Gemäß einer Ausführungsform will die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst, das dadurch gewinnbar ist, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einerseits einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nichtnachzuweisenden Bakterien angehören,

- (a) in an sich bekannter Weise aus einem Fseudomonas-Stamm dieser Gruppen (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt /erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,.... und/oder nten Fseudomonas-Stamm dieser Gruppen jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas von der nicht-nach-zuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

Das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann dadurch gewinnbar sein, daß man von Stämmen ausgeht, die einerseits nachzuweisenden Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht nachzuweisenden Bakterien eines anderen

Genus (anderer Genera) als Pseudomonas angehören.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst, das dadurch gewinnbar ist, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden und einer nichtnachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas angehören,

- (a) in an sich bekannter Weise aus einem *Fseudomonas-*Stamm dieser Gruppen (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrentenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,.... und/oder nten Pseudomonas-Stamm dieser Gruppen jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* von der nicht-nach-zuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

Das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann dadurch gewinnbar sein, daß man von Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien der Species *Pseudomonas aeruginosa* und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien anderer Species angehören.

Ferner betrifft die Erfindung ein Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.

Ferner betrifft die Erfindung ein derartiges Nucleinsäuremolekül mit einer gegenüber dem vorstehenden Nucleinsäuremolekül verkürzten Sequenz, und zwar der Sequenz des Bereiches oder im Bereich der Nukleptidpositionen 12 bis 131.

Ferner betrifft die Erfindung ein derartiges Nucleinsäuremolekül mit einer gegenüber einem Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 verkürzten Sequenz, nämlich

- (i) der SEQ ID NO 3 oder
- (ii) der SEQ ID NO 4 oder
- (iii) der SEQ ID NO 5 oder
- (iv) der zu (i), (ii) und (iii) jeweils komplementären Sequenz.

Ferner betrifft die Erfindung ein Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 2 oder der hierzu komplementären Sequenz.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette

- (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
- (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem

- Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
- (iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Mukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
- (iv) zu mindestens 90 % mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist.

Ein derartiges erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotide lang ist.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es

- (i) als DNA oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA oder
- (iii) als PNA vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

So kann ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül dadurch modifiziert sein, daß bis zu 20 % der Nukleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

Ferner kann das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert sein, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch einen Kit für analytische Nachweisverfahren gelöst, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, wobei der Kit gekennzeichnet ist durch ein oder mehrere erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch eine Verwendung von einem oder mehreren erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen oder eines erfindungsgemäßen Kits zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien gelöst, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung Pseudomonas angehören.

Die erfindungsgemäße Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* umfaßt oder durch diese Stämme gebildet wird.

Eine derartige erfindungsgemäße Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* ausschließlich um *Pseudomonas* aeruginosa-Stämme handelt.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nichtnachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer
Nukleotidposition im Bereich eines erfindungsgemäßen
Nucleinsäuremoleküls unterscheidet.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz unterscheidet.

Zur Detektion von spezifischen Mikroorganismen mittels
Nucleinsäure-Hybridisierung oder -Amplifikation werden
erfindungsgemäß also keimspezifische Oligonukleotide
eingesetzt. Keimspezifische Oligonukleotide sind
Nucleinsäuren, 10 bis 250 Basen (vorzugsweise 15 bis 30
Basen) lang, deren Basensequenz charakteristisch für einen
spezifischen Mikroorganismus oder eine Gruppe von
Mikroorganismen ist. Eine Hybridisierung an DNA bzw. eine
Amplifikation von DNA bei Einsatz dieser keimspezifischen
Oligonukleotide (z.B. als Primer oder Sonden) mit den oben
genannten Verfahren kann, unter geeigneten
Reaktionsbedingungen, nur dann erfolgen, wenn die DNA der
jeweils nachzuweisenden Mikroorganismen anwesend ist.

Prokaryontische Ribosomen beinhalten drei distinkte Nucleinsäurekomponenten, welche allgemein als 5S, 16S und 23S rRNA (ribosomale Ribonucleinsäure) bekannt sind. Die genetische Information für diese Ribonucleinsäuren (rDNA) ist im Genom typischerweise in Form von Tandems angeordnet. Die Organisation einer solchen Einheit ist 16S-23S-5S, wobei die drei Gene durch kurze hypervariable intergenische Regionen voneinander getrennt sind. Die Einheiten sind im Genom mehrfach vorhanden, wobei die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten in verschiedenen Bakterien variieren kann. Die hohe Konservierung der DNA-Sequenz im Bereich der 16S rDNA, der 23S rDNA und der 5S rDNA über das gesamte Bakterienreich ermöglicht ein Design von nicht-spezifischen Oligonukleotiden auch ohne genaue Kenntnis der DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Mikroorganismen. Solche nicht-spezifischen Oligonukleotide sind charakteristisch für eine größere, in der Regel phylogenetisch verwandte Gruppe von Mikroorganismen. Durch Einsatz dieser nicht-spezifischen Oligonukleotide gelingt dem Fachmann, z.B. nach entsprechenden Vorversuchen durch DNA-Amplifikation mittels PCR, die Isolation von rDNA-Fragmenten, z.B. der 23S/5S intergenischen Region eines beliebigen Mikroorganismus. Durch DNA-Sequenzierung kann dann die Sequenz der hypervariablen intergenischen Regionen des betreffenden Mikroorganismus bestimmt werden.

DNA-Sequenzierung der 23S/5S intergenischen Region einer möglichst großen Anzahl nachzuweisender Bakterien (z.B von verschiedenen *Pseudomonas-*Spezies) einerseits und nachfolgender Vergleich dieser DNA-Sequenzen andererseits erlauben das Auffinden von DNA-Bereichen, die in der untersuchten Gruppe (z.B. alle *Pseudomonas-*Spezies) nicht oder nur unwesentlich verändert ist.

DNA-Sequenzierung der 23S/5S intergenischen Region ausgewählter nicht-nachzuweisender Bakterien (z.B. Bakterien die nicht zur Gattung Pseudomonas gehören) einerseits und nachfolgender Vergleich dieser DNA-Sequenzen mit der Sequenz der nachzuweisenden Bakterien (z.B. verschiedener Pseudomonas-Spezies) andererseits erlaubt das Auffinden von DNA-Sequenzen, die für die nachzuweisenden Bakterien (z.B. alle Pseudomonas-Spezies) charakteristisch sind. Aus diesen DNA-Sequenzen können wiederum Oligonukleotide abgeleitetet werden, die als Primer und/oder Sonden in auf Nucleinsäuren basierenden Verfahren einsetzbar sind, mit dem Ziel, die jeweilige Gruppe von Bakterien (z.B. alle Spezies der Gattung Pseudomonas) spezifisch nachzuweisen.

Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen DNA-Sequenzen zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere Bakterien der Spezies Pseudomonas aeruginosa, basieren auf der 23S/5S intergenischen Region und dem direkt angrenzenden Bereich der 23S rDNA. Die DNA-Sequenz in dieser Region wurde für eine Vielzahl von Bakterien bestimmt. Nach exakten Sequenzvergleichen wurden keimspezifische Nucleinsäuresequenzen bestimmt, für Primer und/oder Sonden für einen Einsatz in einem Spezies-/Genus-spezifischen Nachweisverfahren benutzt werden können.

Zum Nachweis der jeweiligen Gruppe von Mikroorganismen werden Nucleinsäuren, vorzugsweise genomische DNA, zunächst aus den in einer zu untersuchenden Probe bzw. Bakterienkultur enthaltenen Zellen freigesetzt. Mittels Nucleinsäurehybridisierung kann dann, und zwar unter Einsatz der erfindungsgemäßen keimspezifischen Oligonukleotide als Sonde, der direkte Nachweis von keimspezifischen Nucleinsäuresequenzen in der zu untersuchenden Probe erfolgen. Geeignet hierzu sind verschiedene dem Fachmann bekannte Verfahren, wie z.B. "Southern blot" oder "dot blot".

Bevorzugt ist jedoch, vor allem wegen der höheren Empfindlichkeit, ein indirektes Nachweisverfahren, bei dem die gesuchten DNA/RNA-Sequenzen zunächst mittels der o.g. Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren, vorzugsweise PCR, amplifiziert werden.

Die Amplifikation von DNA/RNA unter Verwendung der genannten Verfahren kann unter Einsatz von keimspezifischen Oligonukleotiden als Primer erfolgen. Dabei werden nur in dem Fall spezifische Amplifikate gebildet, in dem DNA/RNA des nachzuweisenden Mikroorganismus anwesend ist. Durch eine nachgeschaltete Detektionsreaktion unter Verwendung von keimspezifischen Oligonukleotiden als Sonden kann die Spezifität des Nachweisverfahrens erhönt werden. Für diese nachgeschaltete Detektionsreaktion ist ebenso die Verwendung von nicht-keimspezifischen Oligonukleotiden möglich.

Alternativ kann die Nucleinsäure-Amplifikation auch in Anwesenheit eines oder mehrerer nicht-spezifischer Oligonukleotide durchgeführt werden, so daß möglicherweise auch DNA/RNA anderer, nicht-nachzuweisender Mikroorganismen amplifiziert werden kann. Ein derartiges Amplifikationsverfahren ist in der Regel weniger spezifisch und sollte daher durch eine nachfolgende Detektionsreaktion mit einem oder mehreren keimspezifischen Oligonukleotid(en) als Sonde(n) abgesichert werden.

Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren bekannt, mit denen die bei den indirekten Verfahren entstehenden Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden können. Dazu gehören u.a. die Visualisierung mittels Gelelektrophorese, die Hybridisierung von Sonden an immobilisierte Reaktionsprodukte [gekoppelt an Nylon- oder Nitrocellulose-Filter ("Southern blots") oder z.B. an "beads" oder Mikrotiterplatten] und die

Hybridisierung der Reaktionsprodukte an immobilisierte Sonden (z.B. "reverse dot blots" oder mit Sonden gekoppelte "beads" oder Mikrotiterplatten).

Es sind eine Vielzahl verschiedener Varlanten beschrieben, mit denen keimspezifische Oligonukleotide (z.E. Sonden und Primer) für die beschriebenen direkten oder indirekten Nachweisverfahren markiert bzw. modifiziert werden können. So können diese beispielsweise radioaktive, farbige, fluoreszierende oder anderweitig modifizierte bzw. modifizierende Gruppen enthalten, beispielsweise Antikörper, Antigene, Enzyme bzw. andere Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen. Sonden bzw. Frimer können entweder natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte doppelsträngige oder einzelsträngige DNA oder RNA sein bzw. modifizierte Formen von DNA oder RNA, wie z.B. PNA (bei diesen Molekülen sind die Zucker-Einheiten durch Aminosäuren oder Peptide ausgetauscht). Einzelne oder mehrere Nukleotide der Sonden oder Primer können gegen analoge Bausteine (wie z.B. Nukleotide, die in der Ziel-Nucleinsäure nicht natürlich vorkommen) ersetzt sein. Bei den o.g. indirekten Nachweisverfahren kann Detektion auch über ein internmarkiertes Amplifikat geführt werden. Dies kann z.B. über den Einbau von modifizierten (z.B. an Digoxigenin oder an Fluorescein gekoppelten) Nukleosidtriphosphaten während der Amplifikationsreaktion erfolgen.

Geeignet als erfindungsgemäße keimspezifische Oligonukleotide sind Nucleinsäuren, vorzugsweise 10 bis 250 Basen und insbesondere 15 bis 30 Basen lang, die mindestens in einer 10 Basen langen Sequenz mit den unten angegebenen Sequenzen 1 bis 5 oder den hierzu komplementären Sequenzen übereinstimmen. Geringere Abweichungen (1 bis 2 Basen) in dieser 10 Basen langen Sequenz sind möglich, ohne daß die jeweils angegebene Spezifität bei der Amplifikation und/oder Hybridisierung

verloren geht. Dem Fachmann ist bekannt, daß im Falle solcher geringeren Abweichungen die Reaktionsbedingungen entsprechend verändert werden müssen; vgl. beispielsweise T. Maniatis, Molecular Cloning, Herausgeber G. Sambrook & E.F. Fritsch, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

Die Sequenz von *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) im Bereich der 23S/5S intergenischen Region lautet:

(Sequenz 1 = SEQ ID NO 1))

ATAACACCCAAACATCTGAYGATTGTGTGTTGTAAGGTGAAGTCGACGAACCGAAAGTTCG CATGAACCGCAAACACCTTGAAATCACATACCTGAATCCGGATAGACGTAAGCCCAAGCGAA CGGATAT

Außerdem wurde die Sequenz im Bereich der 23S/5Sintergenischen Region für 6 weitere Stämme der Spezies

Pseudomonas aeruginosa sowie für mindestens je einen Stamm der folgenden Spezies bestimmt: Pseudomonas asplenii, Pseudomonas citronellosis, Pseudomonas corrugata, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas fragi, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas pseudoalcaligenes, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas syringae. Die Sequenzvergleiche ergaben, daß sich mehrere, von Sequenz 1 abgeleitete Oligonukleotide für den selektiven Nachweis von Bakterien der Spezies Pseudomonas aeruginosa eignen. Geeignet für solche keimspezifischen Oligonukleotide ist die Sequenz der Region (12-131).

Von Sequenz 1 wurden folgende, als Primer für die PCR (Sequenz 3 und 5) und als Sonde (Sequenz 4), besonders geeignete Oligonukleotide abgeleitet.

Oligonukleotid Pal (Sequenz 2) entspricht Position 2823-2842 eines 23S rRNA-Gens von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 [Toschka et al. (1987), Nucleic Acids. Res. 15, 7182]:

Oligonukleotid Pa1: (Sequenz 2 = SEQ ID NO 2) 5'GATAGGCTGGGTGTAAGC-3'
Oligonukleotid Pa2: (Sequenz 3 = SEQ ID NO 3) 5'CTTGGGCTTACGTCTATCCG-3'
Oligonukleotid Pa3: (Sequenz 4 = SEQ ID NO 4) 5'-TTCAGGTATG
TGATTTCAAG GTG-3'
Oligonukleotid Pa4: (Sequenz 5 = SEQ ID NO 5) 5'GACGATTGTGTGTGTAAGGTGA

Beispiel 1: Nachweis von Bakterien der Spezies *Pseudomonas* aeruginosa mit der Polymerase-Kettenreaktion

Aus Reinkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien wurde DNA mittels Standardverfahren isoliert. Je ca. 10 bis 100 ng dieser DNA-Präparationen wurde dann in Gegenwart von je 0,4  $\mu$ M Oligonukleotid Pal und Pa2 oder Pa4 und Pa2, 200  $\mu$ M dNTP's (Boehringer Mannheim), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,01 % Tween 20 und 0,03 U/ $\mu$ l Taq-Polymerase (Biomaster) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer 9600 (Pal und Pa2)/ Biometra TRIO-Thermoblock (Pa4 und Pa2) Thermocycler mit den nachfolgend aufgeführten Thermoprofilen durchgeführt:

## a) Amplifikation mit Oligonukleotid Pal und Pa2

 initiale Denaturierung	95	°C	5	min
 1. Amplifikation (15 Zyklen)	94	°C	35	sek
	68	°C	30	sek
•	72	°C	30	sek
 2. Amplifikation (20 Zyklen)	94	°C	35	sek
(	64	°C	30	sek
	72	°C	30	sek

- finale Synthese	72 °C	5 min
b) Amplifikation mit Oligonukleotid Pa	a4 und Pa2	
- initiale Denaturierung	95 °C	5 min
- Amplifikation (35 Zyklen)	95 °C 62 °C 72 °C	30 sek 30 sek 20 sek
- finale Synthese	72 °c	5 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid visualisiert. Die erwarteten Produkte von 191 bp /102 bp Länge wurden nur in den Fällen beobachtetet, in denen DNA von Stämmen der Spezies Pseudomonas aeruginosa anwesend war (vergleiche Tabelle 1), nicht aber bei Anwesenheit von DNA der anderen getesteten Bakterien. Nach Beendigung des Laufes wurde die in den Gelen enthaltene DNA mittels Standard-Methoden auf Nylon-Filter transferiert und zur Überprüfung der Spezifität mit dem am 5'-Ende biotinylierten Oligonukleotid Pa3 (Sequenz 4) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in 5 x SSC , 2 %Blocking Reagenz, 0,1 % Laurylsarcosin, 0,02 % SDS und 5 pmol/ml Sonde für 4 h bei  $48\,^{\circ}$ C. Gewaschen wurde in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 2 x 5 min bei Raumtemperatur und in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 1 x 15 min bei 48°C. Die Detektion erfolgte nach Standard-Methoden mittels Alkalischer Phosphatase-Konjugate (Extravidin, Fa SIGMA, # E-2636) in Anwesenheit von 5-Bromo-4chloro-3-indolylphosphat und 4-Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid (Fa. Boehringer Mannheim).

Auf den Filtern wurde nur in den Fällen eine Bande beobachtet, in denen zuvor auch eine Bande auf dem Agarose-Gel sichtbar war (siehe Tabelle 1). Somit wurde mittels PCR und mittels Hybridisierung die Anwesenheit sämtlicher der 86 getesteten Pseudomonas aeruginosa-Stämme nachgewiesen. Hingegen wurde keiner der getesteten nicht zu dieser Spezies gehörenden Bakterienstämme mit diesem System erfaßt.

Tabelle 1: Resultate der PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden Pal/Pa2 (SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3) und Pa4/Pa2 (SEQ ID NO 5 und SEQ ID NO 3) und nachfolgender Hybridisierung mit dem Oligonukleotid Pa3 (SEQ ID NO 4).

Spezies	Stammbezeichnung	Pa1/Pa2	Pa4/Pa2
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 10145	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 14886	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 15522	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 15691	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 15692	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 21472	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 21776	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 33350	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 33361	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 33818	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 33988	+	+
Pseudomonas aeruginosa	LMG 8029	+	+
Pseudomonas aeruginosa	DSM 288	+	+
Pseudomonas aeruginosa	DSM 939	+	+
Pseudomonas aeruginosa	DSM 1117	+	+
Pseudomonas aeruginosa	DSM 1253	+	+
Pseudomonas aeruginosa	DSM 1299	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 682	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 4283	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 4880	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 4937	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 4938	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5258	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5594	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5595	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5596	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5597	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5598	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5599	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5600	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5601	+	+

Pseudomonas aeruginosa	BC 5602	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5603	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5604	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5606	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5607	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5917	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5918	   <del> </del>	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5919	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5920	1+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5921	1+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5922	1+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5923	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5924	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5925	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5926	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5927	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5928	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5929	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5930	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5932	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5933	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5934	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7046	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7047	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7048	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7049	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7050	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7051	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7052	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7053	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7054	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7055	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7056	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7057	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7058	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7059	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7060	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7061	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7062	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7063	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7064	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7065	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7066	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7067	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7068	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7069	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7070	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7071	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7072	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7073	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7474	n.d.	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7475	n.d.	ţ.
Pseudomonas aeruginosa	BC 8468	n.d.	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 8493	n.d.	+

Pseudomonas alcaligenes	DSM 50342	-	-
Pseudomonas asplenii	DSM 50254	-	-
Pseudomonas cepacia	BC 3134	-	-
Pseudomonas chlororaphis	BC 1753	_	-
Pseudomonas citronellosis	DSM 50332	-	_
Pseudomonas corrugata	DSM 7228	-	_
Pseudomonas fluorescens	BC 950	n.d.	-
Pseudomonas fluorescens	BC 4882	_	
Pseudomonas fluorescens	BC 2439	_	_
Pseudomonas fragi	DSM 3456	_	_
Pseudomonas indigofera	BC 1105	n.d.	-
Pseudomonas mendocina	DSM 50017	-	
Pseudomonas oleovorans	DSM 1045	-	
Pseudomonas pickettii	BC 3323	_	_
Pseudomonas	DSM 50188	_	-
pseudoalcaligenes			
Pseudomonas putida	BC 4941		-
Pseudomonas putida	DSM 291	í –	-
Pseudomonas putida	DSM 548	-	_
Pseudomonas putida	DSM 549	n.d.	-
Pseudomonas putida	ATCC 950		
(ovalis)			
Pseudomonas stutzeri	BC 4940		-
Pseudomonas syringae	DSM 10604	-	-
Citrobacter amalonaticus	DSM 4593	-	n.d.
Enterobacter aerogenes	DSM 30053	-	n.d.
Escherichia coli	ATCC 8739	_	n.d.
Escherichia hermanii	DSM 4560	_	n.d.
Klebsiella pneumoniae	BC 5362		n.d.
Klebsiella terrigena	BC 4700	-	n.d.
Proteus vulgaris	DSM 2024	_	n.d.
Providencia stuartii	BC 5950	-	n.d.
Salmonella Anatum	BC 2284	-	n.d.

BC: BioteCon-Stammsammlung, n.d.: nicht durchgeführt.

#### Patentansprüche

- 1. Nucleinsäuremolekül, dadurch gewinnbar, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einerseits einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht-nachzuweisenden Bakterien angehören,
- (a) in an sich bekannter Weise aus einem Stamm der genannten Bakterien (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,.... und/oder nten Stamm der genannten Bakterien jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas von nicht-nachzuwei-senden Bakterien anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.
- 2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gewinnbar, daß man von Stämmen ausgeht, die einerseits nachzuweisenden

Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht nachzuweisenden Bakterien eines anderen Genus (anderer Genera) als *Pseudomonas* angehören.

- 3. Wucleinsäuremolekül, dadurch gewinnbar, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einer nachtuweisenden und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas angehören,
- (a) in an sich bekannter Weise aus einem *Fseudomonas-*Stamm dieser Gruppen (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,.... und/oder nten Pseudomonas-Stamm dieser Gruppen jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas von der nicht-nach-zuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

- 4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 3, dadurch gewinnbar, daß man von Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien der Species *Pseudomonas aeruginosa* und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien anderer Species angehören.
- 5. Nucleinsäuremolekül insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.
- 6. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 5 verkürzter Sequenz, und zwar der Sequenz des Bereiches oder im Bereich der Nukleotidpositionen 12 bis 131.
- 7. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 5 verkürzter Sequenz, nämlich
- (i) der SEQ ID NO 3 oder
- (ii) der SEQ ID NO 4 oder
- (iii) der SEQ ID NO 5 oder
- (iv) der zu (i), (ii) und (iii) jeweils komplementären Sequenz.
- 8. Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 2 oder der hierzu komplementären Sequenz.
- 9. Nucleinsäuremolekül, dadurch *gekennzeichnet*, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette
- (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
- (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
- (iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden

Ansprüche übereinstimmt oder

- (iv) zu mindestens 90 % mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist.
- 10. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 3, dadurch **gekennzeichnet**, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotide lang ist.
- 11. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.
- 12. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß es
- (i) als DNA oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA oder
- (iii) als PNA vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

- 13. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch modifiziert ist, daß bis zu 20 % der Nukleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.
- 14. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert ist, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten

Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

- 15. Ein oder mehrere Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in Gegenwart fakultativer Hilfsstoffe und in Form eines Kits für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas.
- 16. Verwendung ein oder mehrerer Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 oder in Form eines Kits gemäß Anspruch 15 zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung Pseudomonas angehören.
- 17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* umfaßt oder durch diese Stämme gebildet wird.
- 18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* ausschließlich um *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme handelt.
- 19. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.
- 20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß

man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt.

- 21. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleptidposition im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 unterscheidet.
- 22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch *gekennzeichnet*, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines
  Nucleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 5 unterscheidet.